Institut d'Hygiène et de Bactériologie de l'Université de Berne
(Directeur: Prof. Dr. C. Hallauer)

(Travail effectué sous la direction de P. D. Dr. med. R. Regamey)

Sur la concentration et la purification de la toxine et du toxoïde formolé tétaniques par le sulfate de soude et la chromatographie

Thèse

présentée à la Faculté de Médecine de l'Université de Berne
pour l'obtention du grade de Docteur en Médecine

par

MARC NEYROUD

de Montreux (Vaud)

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546502_0086

Institut d'Hygiène et de Bactériologie de l'Université de Berne
(Directeur: Prof. Dr. C. Hallauer)

(Travail effectué sous la direction de P. D. Dr. med. R. Regamey)

Sur la concentration et la purification de la toxine et du toxoïde formolé tétaniques par le sulfate de soude et la chromatographie

Thèse

présentée à la Faculté de Médecine de l'Université de Berne
pour l'obtention du grade de Docteur en Médecine

par

MARC NEYROUD

de Montreux (Vaud)

Acceptée par la Faculté de Médecine sur la proposition du Prof. Dr. C. Hallauer.

Berne, le 26 janvier 1944.

Le Doyen:

Prof. Dr. E. Glanzmann.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A ma femme

Je tiens à exprimer ici ma profonde gratitude à mon maître, Monsieur le Professeur Hallauer, ainsi qu'à Monsieur le Dr. Regamey, P.-D., qui a bien voulu se charger de la direction de ce travail.

On sait que, sous l'influence prolongée du formol et de la chaleur (Ramon), *l'ectotoxine* que produisent dans leur bouillon de culture les bacilles tétaniques, diphtériques, les staphylocoques, ainsi que d'autres microbes encore, perd peu à peu ses propriétés toxiques pour ne conserver que sa fonction antigénique. C'est *l'anatoxine*, toxoïde formolé ou « Formoltoxoid » des auteurs allemands. Cette propriété antigénique permet d'obtenir, chez l'animal ou chez l'homme, une immunité active contre le tétanos ou la diphtérie par exemple.

L'anatoxine contient deux éléments essentiels, qui vont contribuer tous deux à l'immunisation :

l'antigène, spécifique, et

le ballast, représenté par toutes les substances protéiniques non spécifiques du bouillon.

Si ce ballast peut être considéré comme un adjuvant non spécifique de l'antigène, il est aussi responsable des réactions d'ordre anaphylactique, parfois très graves, que l'on observe au cours de l'immunisation active *(Whittingham*[44], *Parish et Oakley*[45], *Cooke, Hampton, Shermann et Stull*[46]*)*. C'est pourquoi l'on s'est efforcé de *purifier* l'anatoxine, de la débarrasser tout ou partie de ce ballast indésirable. On cherche encore à ralentir l'élimination du toxoïde hors de l'organisme pour prolonger son activité dans le temps; c'est le principe des antigènes-dépôts : toxoïde précipité par l'alun, ou adsorbé sur des sels d'alumine.

Le problème de la purification des anatoxines fut étudié parallèlement à celui de la purification des sérums antitoxiques mais, semble-t-il, avec moins de rigueur.

Toutes choses étant égales d'ailleurs, l'immunité active est fonction de la quantité d'antigène inoculée. Aussi s'est-on efforcé de *concentrer* les anatoxines, afin d'inoculer une dose maxima d'antigène sous un volume restreint. Cette concentration du toxoïde va souvent de pair avec sa purification. Depuis une quinzaine d'années, la question de l'immunisation active de l'homme ou de l'animal contre le tétanos ou la diphtérie se résume ainsi :

obtenir une anatoxine qui contienne *beaucoup d'unités antigéniques et peu de ballast original*, c'est-à-dire un toxoïde dont la fonction

$$\frac{\text{unités floculantes (U. F.)}}{\text{cc}^*)}$$

soit élevée, et la fonction

$$\frac{\text{mgr. azote (N)}}{\text{cc}}$$

soit très basse, en d'autres termes une anatoxine dont le quotient

$$\frac{\text{U. F.}}{\text{mgr. N.}}$$

soit le plus grand possible. De nombreuses méthodes furent préconisées pour la concentration et la purification des toxines d'abord, puis des anatoxines. La majorité des travaux étudient l'antigène diphtérique; les recherches sur le traitement de la toxine et du toxoïde tétaniques sont beaucoup plus récentes et moins nombreuses. Voici, brièvement résumées avec leurs avantages et leurs inconvénients, les principales méthodes proposées pour la purification et la concentration de ces antigènes.

L'acide *acétique (Watson et Wallace* [2], *Watson et Langstaff* [3], *Locke et Main* [4], *Lichtenstein* [14]) et plus souvent l'acide *chlorhydrique (Sedallian et Gaumont* [5], *Koulikoff et Smirnow* [6], *Siebenmann* [7], et d'autres auteurs [8], [9], [10], [11], [12], [13]) furent expérimentés. Par simple abaissement du pH à 4,7 (qui paraît être le point isoélectrique des protéines liées à l'antigène), on obtient une floculation de l'anatoxine, le floculat entraînant la presque-totalité de l'élément antigénique. Mais il semble que, de ce fait, le toxoïde soit assez gravement lésé.

L'acide *trichloracétique (Boivin et Izard* [15], *Ramon, Boivin et Richou* [16]) permet à froid, à 0° et au pH de 3,5 environ, une purification très poussée avec élimination de 99 % de l'azote et une perte de 25 % du pouvoir antigénique.

L'action combinée de *l'acide et de l'alcool* donna également à *Bunney, Cianciarulo et Kiamil* [17] une purification de 99 %, avec récupération de 70 à 80 % de la fonction toxique.

Hansen et Schmidt [18] constatent qu'à -10° *l'alcool méthylique* purifie très bien, mais attaque aussi la toxine, tan-

---

* Notre travail n'intéressant que des expériences «in vitro», nous continuerons de postuler, à la suite de *Ramon*, que la teneur en unités floculantes va de pair avec le pouvoir antigénique ou immunisant, bien que cet aphorisme soit, avec raison, battu en brèche par *Prigge* [1].

dis que *l'alcool éthylique* purifie moins parfaitement, mais ne modifie pas la toxine.

L'acétone à froid donna de bien meilleurs résultats à *Theorell et Norlin* [19] qu'à *Wadsworth, Quigley et Sickers* [20], [21]. Les premiers de ces auteurs utilisèrent une anatoxine diphtérique titrant 60 U. F. et 8,19 mgr. d'azote par cc., soit 136 gamma d'azote par U. F. et obtinrent ainsi un produit purifié n'ayant plus que 0,86 gamma d'azote par U. F., c'est-à-dire 158 fois plus pur. L'acétone fut encore utilisé par *Moloney et Orr* [22], qui purifient leur antigène par trois méthodes successives : précipitation au point isoélectrique en présence de chlorure de fer, précipitation ultérieure par l'acétone et adsorption finale sur phosphate de fer. La technique d'*Eaton* [23] est encore plus compliquée.

A côté d'autres procédés rarement employés : acide benzoïque en solution saturée dans l'acétone *(Spasowicz et Porebaski* [24]), ultrafiltration *(Zajdel* [25], [26], *Sparrow et Mayzner* [27]), congélation *(Salimbein et Loiseau* [28], *Elkeles* [39]), action des diastases (cf. *Schmidt* [30]), osmose *(Goldie* [31]), deux techniques de concentration et de purification des antigènes sont aujourd'hui très en vogue : ce sont la précipitation par les sels minéraux et l'adsorption aux sels d'aluminium.

Pour la *salure*, on préfère en général le sulfate d'ammonium. *Tasman* et ses collaborateurs [32], [33], [34], [35], ont précisé les modalités de la purification par cette méthode. Le point de saturation se trouve à 735 gr. de $(NH\ 4)_2\ SO_4$ par litre; c'est entre 265 et 450 gr./litre que précipitent les fractions protéiniques portant la quasi-totalité de l'antigène. Et cela quelle que soit la nature de l'anatoxine de départ (pH de 8,0 à 8,8). A demi-saturation, on perd à peu près 50 % de l'antigène, mais le toxoïde est 30 fois plus concentré.

Enfin, *l'adsorption aux sels d'aluminium* (grâce auxquels la résorption de l'antigène dans l'organisme est fortement ralentie — action de dépôt) intéresse la précipitation des anatoxines par l'alun (*Glenny et Barr* [36], *Wells, Graham et Havens* [37], *Park et Schroeder* [38], *Havens et Wells* [39]), et la fixation aux oxydes ou hydrates d'alumine. L'alun à 2—2,5 % permet d'éliminer le 70 % de l'azote, avec perte de 20—30 % de l'antigène; à des taux d'alun plus faibles, l'efficacité de l'antigène reste entière, mais la purification est moindre. La toxine diphtérique se prête bien à la purification par $l'Al_2\ (OH)_3$, modification

C γ (*Willstätter* [40], *Schmidt et Linderström-Lang* [41], *Schmidt* et *Hansen* [42]). Une application indirecte des méthodes d'adsorption par les sels d'alumine a été réalisée par *Ballinari* [43] qui tenta de purifier la toxine tétanique par la chromatographie.

Parmi les nombreux procédés que nous venons d'énumérer, il en est deux que nous nous sommes proposé d'étudier simultanément : *la salure par le sulfate de soude* (moins toxique en injection sous-cutanée que le sulfate d'ammonium) et la *chromatographie.*

I. Salure par le sulfate de soude

La technique que nous avons adoptée comporte cinq temps essentiels :

a. *Salure :* l'anatoxine tétanique originale est chauffée au bain-marie à 37 °, afin de favoriser la dissolution du sel. On ajoute 20 % en poids de sulfate de soude ($Na_2 SO_4$ de Siegfried S. A., Zofingue) et remue avec un bâton de verre jusqu'à ce que le sel soit dissout; puis on laisse reposer pendant 15 minutes, et recueille la mousse formée dans une capsule de porcelaine tarée.

La mousse récoltée, on ajoute 5 % de sel, on recueille la nouvelle mousse après 15 minutes, et ainsi de suite, de 5 en 5 %, jusqu'à saturation certaine (soit au moment où la concentration saline atteint 55 %). Le dernier échantillon de mousse n'est prélevé que le lendemain, alors que l'antigène a passé la nuit à 37 °. Pendant toute l'opération, le bain-marie est maintenu à 37 ° (il n'est en général pas nécessaire de chauffer pendant l'adjonction de sel, car le sulfate de soude est légèrement exotherme).

b. *Dialyse :* après pesage, chaque échantillon de mousse est repris dans de l'eau distillée tiède; la quantité de liquide est empiriquement fixée de telle façon que la masse soit totalement dissoute.

Pour débarrasser les échantillons de leur sulfate de soude, on les met chacun dans un sac à dialyse (simple sac de cellophane monté sur un col de bouteille), que l'on immerge partiellement dans un cristallisoir, à l'eau courante. On les y laisse jusqu'à ce que la réaction au chlorure de baryum ne révèle plus que des traces de sulfate.

En général la dialyse est complète après 4 fois 24 heures : chaque échantillon est alors recueilli et mesuré, ce qui permet de déterminer le volume d'eau attiré ou perdu au cours de la dialyse.

c. *Filtration :* pour conserver stérilement les échantillons, on les soumet à une double filtration sur appareil de Seitz, avec membrane K d'abord, puis avec membrane EK; les filtrats sont recueillis sous une couche de toluol.

d. *Titrage de l'azote :* il se fait à l'appareil de Kjeldahl, selon la technique usuelle.

c. *Titrage de l'antigène :* les épreuves de floculation furent pratiquées avec un sérum étalon de l'Institut sérothérapique et vaccinal suisse à Berne, sérum titrant 600 U. F. par cc. Toutefois, comme certains échantillons avaient une teneur très faible en U. F., nous les avons mélangés à parties égales avec une anatoxine « entraîneuse », qui jaugeait 30 U. F./cc. Un simple calcul permettait alors de fixer la valeur de l'échantillon qui, isolé, ne floculait pas. Cette technique de l'« entraîneuse » ne fut appliquée que pour les concentrés, les filtrats ou éluats de chromatographie titrant moins de 15 U. F./cc.

Voici, à titre d'exemple, les protocoles établis au cours de l'une de nos expériences :

Expérience No 2:

(12—15 novembre 1942) : on part de 10 litres d'anatoxine tétanique No 1053, qui titre 17 U. F. et 4,9 mgr. d'azote par cc.

a. *Salure :* on ajoute successivement, tous les ¼ d'heure, 5 % de sulfate de soude.

Tableau 1. Salure de 10 litres d'anatoxine tétanique avec du sulfate de soude.

Echantillon à	Quantité de Na_2SO_4 ajoutée
20 %	2000 gr.
21—25 %	500 gr.
26—30 %	500 gr.
31—35 %	500 gr.
36—40 %	500 gr.
41—45 %	500 gr.
46—50 %	500 gr.
51—55 %	500 gr.
56—60 %	500 gr.

A 20 % de salure, la mousse qui se forme à la surface du liquide est blanche, spumeuse, mal liée et assez difficile à recueillir. Mais, plus la concentration saline s'élève, plus cette mousse tend à devenir épaisse, de consistance crémeuse, puis « poisseuse », d'un brun de plus en plus foncé. A 55 % de salure, elle prend à peu près l'aspect de l'extrait de viande « Liebig ».

b. *Dialyse :* on dissout les échantillons de mousse dans de l'eau distillée, et on les soumet à la dialyse pendant 4 jours. Voici les observations enregistrées :

Tableau 2. Changements de volumes de liquide pendant la dialyse.

Echantillon à	Quantité de liquide (cc) avant la dialyse	Quantité de liquide (cc) après la dialyse	Quantité d'eau attirée pendant la dialyse en valeur absolue	Quantité d'eau attirée pendant la dialyse en % du volume original
20 %	54	56	+ 2	+ 1
21—25 %	76	101	+25	+33
26—30 %	62	97	+35	+56
31—35 %	63	89	+26	+43
36—40 %	63	78	+15	+24
41—45 %	62	76	+14	+22
46—50 %	58	62	+ 4	+ 7
51—55 %	57	79	+22	+38
56—60 %	54	98	+44	+82

L'échantillon à 20 % de salure se comporte à peu près comme un corps inerte : il n'y a pratiquement pas d'absorption du liquide ambiant dans le sac de cellophane. Les échantillons

suivants ont tous attiré de l'eau, en proportion variable d'ailleurs.

Dans cette expérience, tous les échantillons furent, après la dialyse, amenés à 100 cc. par adjonction d'eau. L'échantillon 21—25 % est amené à 150 cc. C'est à partir de ces dilutions que seront titrés l'azote et l'antigène.

c. *Filtration :* sur membranes Seitz K et EK.

d. *Titrage de l'azote :* chaque échantillon est titré 3 fois à l'appareil de Kjeldahl : les valeurs indiquées intéressent donc une moyenne (tableau 3).

e. *Titrage de l'antigène :* par la méthode de floculation. Lors des titrages avec l'anatoxine 1053 et ses dérivés, nous n'avions pas encore fait appel à la technique de l'« entraîneuse », et les taux inférieurs à 20 U. F./cc. ne purent être recherchés.

Tableau 3. Résultats du titrage de l'azote et des U. F. pour chaque concentré :

Concentré à	mgr. N./cc	U. F./cc	Quotients	
			U. F./mgr. N.	mgr. N./U. F.
20 %	0,77	< 20	?	?
21—25 %	4,27	500	117,09	0,008534
26—30 %	5,74	440	76,65	0,01305
31—35 %	5,60	90	16,07	0,06222
36—40 %	5,60	25	4,46	0,22400
41—45 %	7,28	< 20	?	?
46—50 %	1,54	< 20	?	?
51—55 %	1,19	< 20	?	?
56—60 %	3,15	< 20	?	?
Anatoxine tétanique No. 1053	4,90	17	3,46	0,28824

Il ressort de ce tableau 3 que les quantités d'antigène facilement contrôlables sont précipitées entre 21 et 40 % de sulfate de soude. C'est la fraction recueillie entre 21 et 25 % de salure qui représente l'antigène le plus pur. La fraction suivante est également riche en antigène, tandis que les deux concentrés obtenus entre 31—35 % et 36—40 % de salure contiennent relativement peu d'antigène et beaucoup d'azote. Dans toutes les fractions supérieures à 41 % de sel, on ne retrouva pas d'antigène par la simple méthode de la floculation.

Les fractions d'antigène recueillies aux divers taux de salure représentent à la fois une *concentration* et une *purification* de l'anatoxine :

Tableau 4. Index de concentration et de purification de l'anatoxine tétanique:

Fraction recueillie entre ... de salure	Concentration		Purification	
	U. F./cc	Index C	gamma N/U.F.	Index P
21—25 %	500	**29,4**	8,54	**33,8**
26—30 %	440	**25,9**	13,05	**22,1**
31—35 %	90	**5,3**	62,22	**4,6**
36—40 %	25	**1,5**	224,00	**1,3**
Anatoxine tétanique No. 1053	17	1,0	288,24	1,0

L'index C est le quotient : $\frac{\text{U. F./cc. du concentré}}{\text{U. F./cc. de l'anatoxine}}$

l'index P est le quotient : $\frac{\text{mgr. N./U. F. de l'anatoxine}}{\text{mgr. N. /U. F. du concentré}}$

Les deux index, C et P, permettent de mesurer directement les taux de concentration et de purification des fractions correspondant aux différentes salures. Le tableau 4 démontre clairement que, dans le cas de l'anatoxine tétanique 1053, les meilleures index sont ceux des concentrés obtenus entre 21 et 30 % de sulfate de soude. Ces index ne sont toutefois intéressants que

si la majorité de l'antigène se trouve réunie dans ces fractions. Connaissant le volume de chaque concentré recueilli après la dialyse, il est facile de calculer le *taux de récupération des U. F.*

Tableau 5. Récupération des U. F.

Concentré à :	Volume (en cc)	U.F./cc	Total des U. F.	Pourcentage des U.F. contenues dans les 10 litres d'anatoxine
21—25 %	150	500	75 000	**44,1**
26—30 %	100	440	44 000	**25,9**
31—35 %	100	90	9 000	**5,3**
36—40 %	100	25	2 500	**1,5**
Anatoxine tétanique No. 1053	10000	17	17 000	—
Total				**76,8**

Les échantillons de concentré récoltés entre 21 et 40 % de salure comprennent le 76,8 % des U. F. présentes dans l'anatoxine originale. Les pertes sont donc de 23,2 % ; elles se répartissent sur les diverses fractions qui contenaient moins de 20 U. F. au cc., et que nous n'avons pas étudiées avec des méthodes plus raffinées; elles relèvent encore des pertes de matériel au cours des multiples manipulations : filtrations, etc. Il est possible encore qu'une certaine partie de l'antigène ne « précipite » absolument pas sous l'influence de la salure.

Voici maintenant, comparés à ceux de l'expérience No. 2, les résultats fournis par les *essais No. 4 et 5.*

Tableau 6. Attraction d'eau pendant la dialyse.

Expérience No	2		4		5	
Anatoxine tétanique	1053		1038		1021	
U. F./cc.	17		18		25	
mgr. N./cc.	4,9		5,46		4,83	
Quantité (en cc.)	10 000		20 000		10 000	
Concentré à	Volume en cc. avant dialyse	eau attirée en %	Volume en cc. avant dialyse	eau attirée en %	Volume en cc. avant dialyse	eau attirée en %
20 %	54	+ 1	90	− 6	34	− 12
21—25 %	76	+ 33	104	− 4	43	− 1
26—30 %	62	+ 56	166	+ 2	78	+ 12
31—35 %	63	+ 43	103	+ 7	101	+ 50
36—40 %	63	+ 24	106	+ 25	103	+ 50
41—45 %	62	+ 22	205	+ 45	93	+ 35
46—50 %	58	+ 7	182	+ 47	47	+ 49
51—55 %	57	+ 38	185	+ 62	86	+ 88
56—60 %	54	+ 82	—	—	—	—

Les mousses recueillies à basse salure sont moins hygroscopiques que celles obtenues avec de fortes concentrations salines. Tandis que dans les expériences 2 et 5, nous ne notons pas de courbe régulière, l'essai No. 4 accuse une courbe régulièrement ascendante, où l'attraction de l'eau est en fonction directe du taux de sel. Les pourcentages sont calculés par rapport au volume initial du concentré; ils correspondent au quotient :

$$\frac{\text{(volume avant la dialyse)} - \text{(volume après dialyse)}}{\text{(volume avant la dialyse)}}$$

Dans le tableau suivant, nous résumons les titrages de l'azote et de l'antigène :

Tableau 7.
Titrage de l'azote et des unités floculantes:

Expérience No	2			4			5		
Concentré à	mgr. N/cc	U.F./cc	γ N/U.F.	mgr. N/cc	U.F./cc	γ N/U.F.	mgr. N/cc	U.F./cc	γ N/U.F.
20 %	0,77	20	?	0,84	58	**14.49**	0,35	11	**31,82**
21—25 %	4,27	500	**8,54**	1,12	290	**3,86**	0,98	100	**9,80**
26—30 %	5,74	440	**13,05**	1,40	210	**6,67**	5,67	115	**49.30**
31—35 %	5,60	90	**62,22**	6,46	270	**23,93**	6,93	60	**115,50**
36—40 %	5,60	25	**224,0**	accidenté			6,30	23	**273,91**
41—45 %	7,28	20	?	3,99	14	285,0	3,08	16	**192,5**
46—50 %	1,54	20	?	2,31	2	1155,0	3,01	14	**215,0**
51—55 %	1,19	20	?	3,64	0	./.	6,02	10	**602,0**
56—60 %	3,15	20	?	—	—	—	—	—	—
Anatoxine tétanique	4,90	17	**288,24**	5,46	18	**303,33**	4,83	25	**193,2**

Chaque anatoxine tétanique possède son individualité physico-chimique : taux variable d'azote, taux variable d'antigène, comportement variable à l'égard du sulfate de soude. Cependant, de l'ensemble du tableau 7, il se dégage quelques principes généraux, qui sont mieux marqués encore dans le résumé suivant (tableau 8). Jusqu'à 20 % de salure, l'antigène qui précipite entraîne encore beaucoup de substances protéiniques; l'optimum se situe, pour les 3 anatoxines tétaniques, entre 21 et 25 % de salure. Les concentrés recueillis lorsqu'on rajoute du sel entraînent proportionnellement plus de protéines que d'antigène.

Tableau 8. Index C de concentration et Index P de purification :

Expérience No	2		4		5	
Concentré à	Index C	Index P	Index C	Index P	Index C	Index P
20 %	—	—	3,2	20,9	0,4	6,7
21—25 %	29,4	33,8	16,1	78,6	4,0	19,7
26—30 %	25,9	22,1	11,7	45,5	4,6	3,9
31—35 %	5,5	4,6	15,0	12,7	2,4	1,7
36—40 %	1,5	1,3	—	—	0,9	0,7
41—45 %	—	—	0,8	1,2	0,6	1,0
46—50 %	—	—	0,1	0,3	0,6	0,9
51—55 %	—	—	./.	./.	0,4	0,3

[ ] = maxima

L'index C n'est pas un critère absolu : il est l'image de la concentration obtenue pour un échantillon déterminé; mais sa valeur dépend en grande partie de la quantité de liquide ajoutée à la mousse avant la dialyse, puis de l'eau attirée dans le sac de cellophane pendant la dialyse. Ainsi, en reprenant une mousse dans 200 cc., au lieu de 100 cc. d'eau, on obtient un

index C 2 fois plus faible. *L'index P* par contre représente une valeur absolue, traduisant l'intensité de la purification; pour une même anatoxine et un même taux de salure, que le concentré soit fortement étendu ou non, il reste constant. Son optimum reste régulièrement accroché aux échantillons recueillis entre 21 et 25 % de salure. L'anatoxine de l'expérience No 4 par exemple accuse un index optimum de *78,6*, c'est-à-dire que l'U. F. du concentré à 21—25 % de sulfate de soude contient 78,6 fois moins d'azote que l'U. F. du produit original : on a donc obtenu une *élimination* de

$$100 - \frac{100}{78{,}5} = 98{,}74\,\% \text{ de l'azote.}$$

A partir de 35—40 % de salure, les concentrés contiennent moins d'U. F. et autant, voire même plus d'azote que le toxoïde tétanique original, ce qui signifie qu'à partir de ce taux salin, il n'y a plus ni concentration ni purification.

Qu'en est-il maintenant des *pertes* au cours de l'opération ?

Tableau 9. Récupération des U. F.
(calculées selon le même mode que pour le tableau 5)

Expérience No	2	4	5
Concentré à	Pourcentages des U. F. contenues dans l'anatoxine originale		
20 %	—	1,4	0,1
21—25 %	44,1	8,1	1,7
26—30 %	25,9	9,9	4,0
31—35 %	5,3	8,3	3,6
36—40 %	1,5	4,7 interpolé	1,4
41—45 %	—	1,2	0,8
46—50 %	—	0,2	0,4
51—55 %	—	0,0	0,6
56—60 %	—	—	—
Total récupéré en %	76,8	33,8	12,6
Pertes en %	23,2	66,2	87,4

Les pertes d'antigène sont donc très différentes pour les 3 expériences relatées, passant de 23,2 % pour l'essai No. 2 à 87,4 % pour l'essai No 5. Ainsi toutes les anatoxines tétaniques ne se prêtent pas à la purification avec les mêmes avantages d'économie. En se basant sur les expériences 2 et 4, on peut admettre que, pratiquement, une salure unique à 30—35 % permet de retrouver dans la mousse un taux utile d'antigène. Pour corroborer cette affirmation, nous avons été conduits à changer notre technique de salure, et nous avons adopté la méthode relatée ci-après.

Expérience No 6 :

La même anatoxine tétanique que celle de l'essai No. 5, soit le toxoïde No. 1121, titrant 25 U. F. et 4,83 mgr. N par cc., est répartie en 7 lots de 2 litres chacun. Chaque volume d'antigène est additionné d'une quantité croissante de sulfate de soude : le premier échantillon est salé à 20 %, le second en une fois à 25 %, le troisième à 30 %, et ainsi de suite, toutes les autres conditions d'expérience restant par ailleurs les mêmes.

Tableau 10. Observations sur les mousses et la dialyse.

Salure à :	Poids de la mousse recueillie	Volume avant dialyse	Volume après dialyse	Quantité d'eau attirée par rapport à la mousse	Quantité d'eau attirée par rapport au volume initial
20 %	2 gr.	22 cc.	27 cc.	+ 250 %	+ 23 %
25 %	8 gr.	38 cc.	48 cc.	+ 125 %	+ 26 %
30 %	14 gr.	64 cc.	82 cc.	+ 129 %	+ 28 %
35 %	26 gr.	96 cc.	102 cc.	+ 23 %	+ 6 %
40 %	11 gr.	81 cc.	110 cc.	+ 264 %	+ 36 %
45 %	11 gr.	81 cc.	104 cc.	+ 209 %	+ 28 %
50 %	16 gr.	86 cc.	127 cc.	+ 256 %	+ 43 %

Plus la concentration saline est grande, plus l'on est en droit d'attendre une mousse abondante : cette spéculation ne se vérifie cependant pas. Il existe un seuil entre 30 et 35 % de concentration saline, où la mousse est plus abondante que lors

de l'emploi de quantités voisines de sulfate de soude. Tout se passe comme si, à 30—35 % de salure, la mousse retenait dans ses mailles un plus grand volume d'anatoxine salée.

Par ailleurs, l'attraction d'eau pendant la dialyse n'obéit pas à une loi rigide. Dans son ensemble, elle donne une courbe ascensionnelle, mais avec une forte dépression, qui correspond, là encore, à la concentration saline de 35 %.

Tableau 11. Titrages de l'azote et des U. F.

Salure à	mgr. N/cc.	U.F./cc.	gamma N/U.F.
20 %	0,28	13	21,5
25 %	0,42	65	6,5
30 %	0,77	70	11,0
35 %	1,68	75	22,3
40 %	1,82	80	22,8
45 %	1,89	82	23,0
50 %	2,31	85	27,2
Anatoxine No 1121	4,83	25	193,2

Ce tableau 11 étaie nos connaissances : l'augmentation de la concentration saline va de pair avec une augmentation de l'azote : pour un échantillon donné, la quantité d'azote est fonction du degré de salure. Il n'en va pas de même de la teneur en U. F. : on obtient très rapidement un titre élevé d'antigène, à 25 % de salure déjà, mais les échantillons ultérieurs n'accusent pas une forte élévation de leur titre : à 40 %, il semble déjà que la presque totalité des U. F. ait précipité, puisque le titre de 80 U. F./cc. à 40% ne passe qu'à 85 U. F./cc. à 50% de salure : à cette concentration, la totalité de l'antigène précipitable est acquise : en augmentant le taux de sulfate de soude, on n'enrichit plus que l'azote. Ces considérations ressortent encore mieux du tableau 12.

Tableau 12. Index C et P; récupération des U. F.

Concentré à	Index C	Index P	Pourcentages des U. F. contenues dans les 2 litres d'anatoxine originale
20 %	0,52	7,3	0,7
25 %	2,60	29,8	6,2
30 %	2,80	17,6	11,5
35 %	3,00	8,7	15,3
40 %	3,20	8,5	17,6
45 %	3,28	8,4	17,1
50 %	3,4	7,1	21,6

L'anatoxine tétanique 1121 se prête mal à la salure par le sulfate de soude (cf. expérience No. 5). Le rendement quantitatif de la méthode est faible; les avantages qualitatifs soit moins nets que lors des expériences No. 2 et 4 relatées plus haut. Une salure unique à 25 % de sulfate de soude donne une faible récolte en U. F. : 6,2 % seulement, mais l'index P de purifications est élevé: 29,8, c'est-à-dire que l'U. F. a perdu

$$100 - \frac{100}{29,8} = 96,6\,\%$$ de son azote initial.

Discussion

Parmi toutes les méthodes préconisées pour la concentration et la purification des toxines et toxoïdes, la salure au sulfate de soude est une méthode éminemment simple et économique.

La technique adoptée : salure fractionnée et étude des mousses correspondant à des tranches successives de concentration saline comporte une certaine marge de causes d'erreurs. On a recueilli les mousses 15 minutes après la dissolution du sulfate de soude; or, après ce laps de temps, si la majorité de l'antigène réagissant à la concentration saline envisagée s'est déjà amoncelée à la surface du liquide, il existe cependant une fraction de toxoïde qui remonte beaucoup plus lentement, et qui ne sera pas examinée avec l'échantillon en cause. Les concentrés à différents taux de salure correspondent donc à l'antigène qui remonte en surface pendant un temps donné, fixé arbitrairement à 15 minutes. Lors de la récolte des mousses, de leur dissolution, de leur dialyse et de leur filtration, il se produit des pertes de matériel qui ne sont pas négligeables.

Les différents concentrés, pour une même anatoxine, ne peuvent pas être considérés comme des produits « purs », c'est-à-dire provenant rigoureusement d'une concentration déterminée; en effet, lors du prélèvement de la mousse, il reste toujours du matériel accolé aux parois, et que l'on recueillera peut-être avec le concentré suivant.

Dans le calcul des index de concentration et de purification C et P se glissent des erreurs inhérentes à la nature même des méthodes de titration : si les quantités d'azote déterminées à l'appareil de Kjeldahl peuvent être admises comme exactes, les titres antigéniques que donne la floculation ne sont justes qu'à 5 ou 10 % près.

Ces considérations fixent suffisamment l'approximation de nos résultats. Néanmoins, nous pouvons déduire de nos protocoles un certain nombre d'observations qui revêtent un caractère général.

Les différents échantillons *d'anatoxine tétanique* examinés possèdent chacun une individualité physico-chimique; les uns se prêtent très bien à la salure, les autres beaucoup moins bien.

L'adjonction de sulfate de soude fait apparaître une mousse à la surface de l'anatoxine. Dans cette mousse se trouvent des corps très complexes, entre autres l'antigène et des composés azotés. Aux différents taux de salure, les mousses ont un caractère très variable : pâles et peu visqueuses aux basses concentrations, elles n'absorbent que peu ou pas d'eau à la dialyse: brun-foncé en présence de quantités élevées de sulfate de soude, elles sont très visqueuses et attirent beaucoup d'eau pendant la dialyse. Que ce soit entre 21—25 %, ou entre 40—45 %, les mousses contiennent de l'antigène. Nous pouvons en conclure que l'antigène n'est pas influencé par une solution déterminée d'électrolytes. Si l'antigène tétanique est une protéine, cette protéine est de caractère défini, mais de sensibilité peu spécifique en fonction du taux des ions salins. Si l'antigène est seulement accouplé à un support protéinique — tel un groupe prosthétique — ce support n'est pas rigoureusement spécifique par rapport aux électrolytes; il peut être de nature chimique multiple, ce qui expliquerait son comportement envers les diverses concentrations salines.

A 20 % de salure, la quantité d'antigène qui s'élève à la surface est très faible. Pour toutes les anatoxines, c'est dans la mousse qui se forme entre *21 et 25 %* de salure que se réunit la forte majorité de l'antigène, alors qu'un minimum d'azote est entraîné : l'unité floculante peut ne contenir qu'1 % de l'azote total que contient l'U. F. de l'anatoxine originale. Dans la fraction comprise entre 26 et 30 % de salure, la quantité d'antigène est encore élevée, mais celle de l'azote est aussi beaucoup plus forte, donc la purification est moindre.

Dans la pratique de la préparation des anatoxines du commerce, la méthode de salure par le sulfate de soude peut rendre de grands services. Il arrive fréquemment que des lots de toxoïdes soient faibles et, comme tels, inutilisables. En salant ces lots, on récupère — selon l'échantillon — jusqu'à 75 % de l'antigène sous forme de concentré. Ce concentré peut être ensuite étendu avec de l'eau physiologique, au titre antigénique désiré: il peut être mélangé, comme correcteur du titre floculant, à des anatoxines trop faibles, ou servir à la préparation de vaccins mixtes : diphtérique-tétanique par exemple, avec cet avantage de conserver de hauts titres antigéniques. Il peut enfin servir de point de départ à d'autres purifications, soit par nouvelle salure, soit par toute autre méthode.

II. Chromatographie

Dans son travail sur les toxines tétaniques et diphtériques, *Ballinari* [43] s'adresse à la chromatographie pour concentrer ces antigènes. Il conclut que le meilleur adsorbant est l'oxyde d'aluminium ($Al_2 O_3$) en milieu acide, avec optimum entre pH 5,3 et 6,0; mais l'élution s'accompagne de très grosses pertes, de l'ordre de 75 % avec l'anatoxine diphtérique.

Le principe même de la chromatographie est simple : on fait passer un liquide dans une colonne d'adsorbant que contient un tube de verre. Au cours de sa progression à travers la colonne, les constituants du fluide se fixent sur l'adsorbant au gré de leur affinité. Après passage du liquide, la colonne peut être décomposée en plusieurs zones étagées les unes sur les autres: les supérieures contiennent les particules le plus facilement adsorbées. Les substances douées d'une affinité trop faible ou nulle pour la colonne se retrouvent dans le liquide à la sortie du tube. Lorsque l'opération est terminée, deux fractions se présentent : le *filtrat*, où la substance étudiée peut se retrouver tout ou partie, puis la *colonne*, où la substance a pu se fixer. Dans le cas particulier de nos recherches, celui de l'anatoxine tétanique, on peut mesurer le degré d'adsorption par deux méthodes :

a) en calculant le nombre d'U. F. dans le liquide initial, avant son passage dans la colonne, et celui des U. F. du filtrat. La différence des deux valeurs donne la quantité d'U. F. retenues par l'adsorbant.

b) en éluant l'adsorbant, puis en recherchant le titre antigénique dans l'éluat. Au contraire de la première, cette méthode ne donne que des résultats approximatifs, car l'élution n'est jamais parfaite.

Notre appareillage fut identique à celui de *Ballinari* [43]. Nous n'y avons apporté qu'une petite amélioration en recouvrant d'un treillis métallique la face supérieure du bouchon de caoutchouc destiné à supporter la colonne. L'ensemble du filtre placé entre le bouchon et l'adsorbant comportait les couches suivantes :

adsorbant
rondelle de papier-filtre,
épaisseur de laine de verre ou d'ouate,
rondelle de papier-filtre,
treillis métallique,
bouchon

Voici, avec quelques détails, l'une de nos expériences, faite dans le but de déterminer le pH d'adsorption optimum :

Expérience No 7 :

3 échantillons de 200 cc. de l'anatoxine tétanique 1053 sont amenés aux pH suivants :

pH 6,5 : avec NaOH à 4 %,
pH 5,5 : c'est le pH de l'anatoxine originale,
pH 4,5 : avec CH_3COOH à 30 %.

3 colonnes de chromatographie sont montées chacune avec 10 gr. d'oxyde d'aluminium (Siegfried S. A., Zofingue) suspendus préalablement dans une solution-tampon au pH correspondant. Les colonnes sont ensuite « lavées » sous légère pression négative avec des solutions-tampon de Sœrensen :

pour pH 6,5 : 700 cc. de $K\ H_2\ PO_4$ m/15
+ 300 cc. de $Na_2\ H\ PO_4$. 12 H_2O m/15.

pour pH 5,5 : 950 cc. de $K\ H_2\ PO_4$ m/15
+ 50 cc. de $Na_2\ H\ PO_4$ 12 H_2O m/15.

pour pH 4,5 : 200 cc. de $CH_3\ CHOH\ COOH$ m/10
+ 800 cc. de $Na\ CH_3\ COOH$. 3 H_2O m/10.

Ce lavage des colonnes est rendu nécessaire par l'alcalinité de l'$Al_2\ O_3$. Après passage de 800—900 cc. de la solution-tampon, le liquide à la sortie du tube de chromatographie garde à peu de chose près le pH désiré : 6,5, 5,5 et 4,7.

On fait alors circuler les 200 cc. d'anatoxine tétanique : le filtrat est recueilli par fractions séparées, de 50 cc. chacune. Les colonnes d'adsorbant sont ensuite expulsées avec un bâton de verre, et divisées en deux moitiés, l'une supérieure, l'autre inférieure. Chaque fragment est suspendu dans 20 cc. d'eau à pH 7,5, agité longuement, laissé ½ heure à l'étuve, alcalinisé à pH 7,5 par une lessive de soude normale. Puis nouvelle agitation, séjour à l'étuve et une nuit à la glacière ; on centrifuge, décante et recueille enfin chaque éluat dans une bouteille stérile. Nos observations sont résumées dans le tableau No 13.

Tableau 13. Titrages des U. F. dans les filtrats et les éluats.

Colonne à	pH 6,5		pH 5,5		pH 4,5	
	pH	U. F.	pH	U. F.	pH	U. F.
Eluat de la moitié supérieure de la colonne (20 cc.)	7,5	7	7,5	**17**	7,5	8
Eluat de la moitié inférieure de la colonne (20 cc.)	7,5	5	7,5	**15**	7,5	7
Filtrat: 1ère portion (50 cc.)	6,7	9	5,6	6	4,7	?
2ème portion (50 cc.)	6,7	12	5,5	4	4,7	?
3ème portion (50 cc.)	6,7	15	5,6	3	4,7	14
4ème portion (50 cc)	6,7	14	5,5	5	4,7	17
Anatoxine tétanique No 1053	5,5	17				

C'est dans la colonne moyenne, c'est-à-dire à pH 5,5, que l'anatoxine tétanique est le mieux adsorbée : l'éluat de la moitié supérieure de la colonne contient 17 U. F./cc., celui de la moitié inférieure 15 U. F./cc., alors que les titres antigéniques des filtrats sont beaucoup plus bas que celui de l'anatoxine originale. Le titre très faible dans la première portion du filtrat à pH 6,5 peut s'expliquer par la dilution que subit l'anatoxine avec la solution-tampon qui imbibait la colonne au début de l'expérience.

Notons encore que les meilleurs éluats ne marquent aucune concentration d'antigène, puisqu'ils atteignent à peine la valeur de l'anatoxine originale.

La question des pertes en U. F. et de l'élimination de l'azote sera examinée plus loin.

Expérience No 8 :

cet essai avait pour but de déterminer plus exactement le pH d'adsorption optimum, et aussi de comparer l'$Al_2 O_3$ de Siegfried à celui de Brockmann (Merck).

Tabelle 14.
pH des filtrats et titrages des U.F.

Colonne à	pH 6,5				pH 6,0				pH 5,5				pH 5,0			
Adsorbant	B		S		B		S		B		S		B		S	
	pH	U.F.	pH	U.F.	pH	U.F.	pH	U.F.	pH	U.F.	pH	U.F.	pH	U.F.	pH	U.F.
Moitié supérieure de la colonne (éluat)	—	17	—	18	—	19	—	17	—	19	—	19	—	32	—	28
Moitié inférieure de la colonne (éluat)	—	16	—	16	—	16	—	16	—	18	—	17	—	24	—	32
Filtrats	6,9	9	6,8	10	6,7	7	6,5	7	6,3	6	6,2	7	5,7	3	5,7	3
Anatoxine tétanique No 1053	5,5	17														

B = Al_2O_3 selon Brockmann (Merck).
S = Al_2O_3 de Siegfried.

Avec la même anatoxine tétanique No 1053, nous avons préparé pour chaque échantillon 4 colonnes d'adsorbant, à

pH 6,5 — pH 6,0 — pH 5,5 — pH 5,0.

Pour gagner du temps en raccourcissant le lavage, nous avons agité l'oxyde d'aluminium dans un ballon avec une solution-tampon, puis acidifié jusqu'à obtenir le pH désiré. La suspension est ensuite versée dans le tube à chromatographier. On fait alors passer 100 cc. d'anatoxine tétanique dans chaque colonne.

Cependant au cours du passage de l'anatoxine, l'adsorbant libère de l'alcali, et les filtrats n'ont plus exactement le pH original; ces altérations du pH et les titrages des U. F. sont rapportés dans le tableau 14. L'élution des colonnes fut conduite comme pour l'expérience précédente.

Tous les filtrats contiennent moins d'U. F. que l'anatoxine originale. Il s'est donc produit une adsorption. Les deux variétés d'Al_2O_3 examinées — Brockmann et Siegfried — ont le même pouvoir adsorbant. De pH 6,9 à pH 6,2, la fixation de l'antigène sur le sel d'aluminium est mauvaise : elle est bien meilleure à *pH 5,7*, puisque le filtrat ne contient plus que 3 U. F./cc., le 80 % de l'antigène ayant été retenu par l'Al_2O_3. L'adsorption du toxoïde ne se fait pas dans une zone déterminée : elle est répartie sur toute la hauteur de la colonne.

Expérience No 9 :

pour éviter l'alcalinisation secondaire, au cours de la filtration au chromatographe, nous avons préparé la suspension d'adsorbant quelques heures à l'avance, en l'agitant fréquemment entre temps, et en réglant constamment le pH. La colonne formée est encore perfusée avec 1,0 litre de solution-tampon. Cette fois, le filtrat à la sortie de la colonne garde le même pH qu'au départ : 6,0 — 5,7 — 5,4 — 5,0 pour les 4 colonnes.

Après passage de 100 cc. de l'anatoxine 1040 (pH original 6,9; 26 U. F. et 4,84 mgr. N par cc.), les colonnes sont expulsées et divisées en deux moitiés. Chaque fraction est reprise dans 30 cc. d'eau distillée à pH 7,5. Les temps de l'élution sont les mêmes que dans les expériences précédentes. Nous avons, de chaque filtrat et de chaque éluat, déterminé le titre floculant et le taux d'azote total.

Tableau 15. Titrages des U. F.

Colonne à	pH 6,0		pH 5,7		pH 5,4		pH 5,0	
Absordant	B	S	B	S	B	S	B	S
1/2 supérieure de la colonne (éluat)	10	11	5	10	5	9	17	14
1/2 inférieure de la colonne (éluat)	9	10	5	9	6	9	13	14
Filtrat	16	18	18	17	17	17	14	14
Anatoxine tétanique No 1040	26							

De pH 6,0 à pH 5,0 l'adsorption est relativement mauvaise, puisque le filtrat le plus faible contient encore 14 U. F. par cc.; elle est de l'ordre de 30 %. Bien que l'adsorption à pH 5,0 se révèle légèrement supérieure à celle réalisée aux autres pH, il n'y a, semble-t-il, pas de zone optima, et une opération faite en milieu plus acide conduirait à une précipitation du toxoïde, dont le point isoélectrique est voisin de 4,7 : la colonne de chromatographie ne jouerait alors qu'un rôle de simple filtre. Les deux oxydes d'aluminium examinés donnent des résultats superposables.

Les pertes en unités floculantes, calculées pour la colonne de pH 5,0 et l'Al_2O_3 de Brockmann sont les suivantes :

Nombre d'U. F. :

dans l'anatoxine tétanique originale : 100 cc. × 26 U. F. = 2600 U.F.

dans le filtrat : 100 cc. × 14 U.F. = 1400 U.F.
daus l'éluat sup. : 30 cc. × 17 U.F. = 510 U.F.
dans l'éluat inf. : 30 cc. × 13 U.F. = 390 U.F.

unités floculantes récupérées : 2300

unitées floculantes restées adsorbées ou perdues : 2600
− 2300
= 300 U.F.
soit 12 %.

Compte tenu des différentes manipulations, et des pertes de matériel qui leur sont inhérentes, les pertes d'antigène sont ainsi relativement faibles, ce qui démontre soit que l'élution fut très poussée, soit que l'adsorption fut mauvaise.

La *purification* est également mauvaise : les meilleurs éluats obtiennent un index P qui ne dépasse pas 2,3 !

Discussion

Dans ses travaux sur les *toxines* tétanique et diphtérique, *Ballinari* [43] obtint une adsorption élective de l'antigène avec des colonnes chromatographiques d'Al_2O_3. Le principe actif de la toxine était — au pH approprié — fixé dans les quelques centimètres supérieurs de la colonne. Dans nos conditions d'expérience, où nous avons utilisé la même technique et les mêmes adsorbants que cet auteur, il ne fut guère possible de fixer le toxoïde dans une zone donnée de la colonne de chromatographie.

L'emploi de la chromatographie avec l'oxyde d'aluminium selon Brockmann de Merck et l'oxyde d'aluminium de Siegfried ne permettent ni une concentration, ni une purification de l'anatoxine tétanique qui soient d'un intérêt évident.

Conclusions

Des deux méthodes de concentration et de purification auxquelles nous avons soumis l'anatoxine tétanique, la salure au sulfate de soude s'est révélée d'un rendement utile, tandis que la chromatographie avec deux oxydes d'aluminium n'a pas donné de résultats favorables.

L'adjonction de 20 % en poids de sulfate de soude au toxoïde tétanique fait apparaître à la surface du liquide une mousse peu abondante, blanc-jaunâtre, mal liée, qui contient de l'azote et une faible quantité d'antigène. Si l'on augmente de 5 % la concentration saline, il se forme une nouvelle mousse, plus abondante et un peu mieux liée, très riche en antigène, mais relativement pauvre en azote. Avec l'augmentation du taux de salure, de 5 en 5 %, il se forme de nouvelles mousses qui sont de plus

en plus brunâtres, visqueuses et collantes, hydrophiles: elles contiennent de moins en moins d'antigène.

La *salure optimum* est comprise entre 21 et 25 % de sulfate de soude; la mousse recueillie représente alors une forte concentration des unités floculantes. La purification de l'antigène est aussi élevée : l'unité floculante d'anatoxine peut être débarrassée de 98,74 % de son azote original.

Toutes les anatoxines tétaniques ne se prêtent pas avec la même docilité à la purification par le sulfate de soude, et les pertes totales d'antigène, au cours de l'opération, oscillent entre 23 et 87 %.

L'anatoxine tétanique est une solution colloïdale, et, lors de la salure fractionnée, les divers taux d'électrolytes sollicitent des micelles de grandeur différente. A chaque concentration saline correspond une autre fraction protéinique: or chacune de ces fractions contient de l'antigène. On peut en déduire que ce dernier n'est pas lié à une micelle de dimension rigoureusement déterminée. La molécule de toxoïde serait ainsi de nature chimique variable, ce qui ferait admettre pour cette molécule une combinaison d'au moins deux constituants : l'un, le toxoïde tétanique proprement dit, spécifique et identique dans chaque molécule d'anatoxine; l'autre, non spécifique et de structure multiple, qui fixerait la grandeur de la molécule.

La méthode d'enrichissement et de purification par le sulfate de soude trouve une application certaine dans le problème pratique de l'immunisation. Elle permet d'obtenir une plus grande quantité d'antigène par unité de volume, d'éliminer la plupart du ballast indésirable, et de donner une valeur utile aux anatoxines à faible pouvoir floculant.

Nos essais d'enrichissement et de purification de l'anatoxine tétanique par chromatographie n'ont donné par contre aucun résultat pratique intéressant.

Bibliographie

1. *Prigge R.*, Die staatliche Prüfung der Diphtherieimpfstoffe und ihre experimentellen Grundlagen.
   Arbeiten a. d. Staatsinstitut f. exp. Therapie usw. *1935*, fasc. 32, pg. 27, 99.
2. *Watson a. Wallace*, The concentration of diphtheria toxin by acid-precipitation. J. Path. a. Bact. *27*, 289 (1924).
3. *Watson a. Langstaff*, The precipitation and some properties of purified diphtheria toxoid. Biochem. J. *20*, 763 (1926).
4. *Locke a. Main*, The nature of diphtheria toxin. J. infect. Dis. *43*, 41 (1928).
5. *Sedallian et Gaumont*, Sur l'isolement de la fraction active de la toxine diphtérique par abaissement du pH. C. r. Soc. Biol. *97*, 93 (1927).
6. *Koulikoff et Smirnoff*, Nature physico-chimique de la toxine et de l'anatoxine diphtériques.
   Ann. Inst. Pasteur, Paris *41*, 1166 (1927).
7. *Siebenmann*, Ueber Darstellung, Eigenschaften und Wirkung von konzentriertem Toxoid. Zschr. Immunitätsf. *77*, 167 (1932).
8. *Leulier, Sedallian et Clavel*, cités par *Schmidt* [30].
   Bull. Soc. Chim. biol. Paris *11*, 413 (1929).
9. *Schmidt u. Kjaer*, Reinigung und Konzentrierung von Diphtherietoxin und Diphtherieanatoxin durch Ausfällung mit Säuren. Biochem. Zschr. *228*, 291 (1930).
10. *Kissin u. Bronstein*, Zur Frage der Bildung der Anatoxine.
    Zschr. Immunitätsf. *56*, 11 (1928).
11. *Hallauer*, Zur Chemie der bakteriellen Toxine.
    Zschr. f. Hyg. *105*, 138 (1926).
12. *Kellenberger*, Zur Chemie der bakteriellen Toxine. II. Mitteilg.
    Zschr. f. Hyg. *106*, 253 (1926).
13. *Ramon*, La floculation dans les mélanges de toxine et de sérum antidiphtérique.
    Ann. Inst. Pasteur Paris *37*, 1001 (1923).
14. *Lichtenstein*, cité par *Schmidt* [30]. Jahrb. f. Kinderheilkunde 1932, 51, H. 6.

15. *Boivin et Izard,* Méthode pour la purification, à l'acide trichloracétique, des toxines et anatoxines diphtériques, tétaniques et staphylococciques. C. r. Soc. Biol. *124,* 25 (1937).

16. *Ramon, Boivin et Richou,* L'anatoxine diphtérique purifiée au moyen de l'acide trichloracétique et ses propriétés floculante et immunisante.
C. r. Soc. Biol. *124,* 28 (1937).

17. *Bunney, Cianciarulo a. Kiamil,* A study of the acid precipitation of diphtheria toxin.
J. of Immun. *20,* 417 (1931).

18. *Schmidt et Hansen,* Sur la purification de la toxine diphtérique au moyen de l'alcool et de l'acétone.
C. r. Soc. Biol. *105,* 332 (1930).

19. *Theorell u. Norlin,* Hochgereinigtes Diphtherieantigen.
Zschr. Immunitätsf. *91,* 62 (1937).

20. *Wadsworth, Quigley a. Sickles,* The purification and concentration of diphtheria toxoid.
J. exp. Med. *55,* 815 (1932).

21. *Wadsworth, Quigley a. Sickles,* The preparation of diphtheria toxoid by treatment of the toxin with 1 per cent formalin and precipitation with acetone. J. of Immun. *25,* 139 (1933).

22. *Moloney a. Orr.* Biochem. J. *29,* 1525 (1935).

23. *Eaton,* The purification and concentration of diphtheria toxin. I. Evaluation of previous methods ; description of a new procedure.
J. Bact. *31,* 347 (1936).

24. *Spasowicz et Porebaski,* Sur la concentration et la purification de l'anatoxine diphtérique, par l'acide benzoïque comme adsorbant.
C. r. Soc. Biol. *113,* 1267 (1933).

25. *Zajdel,* Sur la purification et la condensation de l'anatoxine diphtérique par l'ultrafiltration.
C. r. Soc. Biol. *111,* 1029 (1932).

26. *Zajdel,* Purification et concentration de l'anatoxine diphtérique par la méthode d'ultrafiltration. Méthodes de vaccinations par l'anatoxine purifiée.
C. r. Soc. Biol. *116,* 239 (1934).

27. *Sparrow et Mayzner,* Vaccination antidiphtérique au moyen d'une anatoxine concentrée et purifiée par l'ultrafiltration.
C. r. Soc. Biol. *111,* 1031 (1932).

28. *Salimbein et Loiseau,* Concentration de la toxine et de l'anatoxine diphtérique au moyen de la congélation.
C. r. Acad. Sci. *199,* 242 (1935).

29. *Elkeles,* La prensa medica Argentina 5, 11. 1936.
Cité par *Schmidt* (30).

30. *Schmidt,* Grundlagen der spezifischen Therapie.
Bruno Schultz Verlag, Berlin 1940.

31. *Goldie,* Concentration de la toxine diphtérique au moyen de l'osmose.
C. r. Soc. Biol. *116,* 17 (1943).

32. *Tasman u. Pondmann,* Zur Reinigung des Diphtherietoxins und Anatoxins.
Zschr. Immunitätsf. *72,* 245 (1931).

33. *Tasman u. van Waasbergen,* Reinigung von Diphtherietoxin und Anatoxin. Vergleichende Reinigungen durch Adsorption an Aluminium-hydroxyd-Suspension und Fällung mit Aluminiumsulfat.
Zschr. Immunitätsf. *75,* 164 (1932).

34. *Brandwijk u. Tasman,* Reinigung und Konzentration von Diphtherietoxin und -anatoxin. Reinigung von Diphtheretoxin durch Aussalzung mit Ammonsulfat.
Zschr. Immunitätsf. *77,* 390 (1932).

35. *Tasman u. Brandwijk,* Reinigung und Konzentration von Diphtherietoxin und -anatoxin.
Zschr. Immunitätsf. *81,* 137 (1933).

36. *Glenny a. Barr,* The precipitation of diphtheria toxoid by potash alum.
J. of Path. *34,* 131 (1931).

37. *Wells, Graham a. Havens,* Am. J. Publ. Health 1932, *22,* 648.
Cité par Schmidt (30).

38. *Park a. Schröder,* Diphtheria toxin-antitoxin and toxoid. A comparison.
Amer. J. Publ. Health *22,* 7 (1932).

39. *Havens u. Wells,* Precipitated diphtheria toxoid. Preparation and antigenic activity.
J. inf. Dis. *53,* 138 (1933).

40. *Willstätter,* Chem. Berichte 1923, 56, 1117 u. 1924, 57, 1088.
Cité par Schmidt (30).

41. *Linderström-Lang et Schmidt,* Sur la purification de la toxine diphtérique.
C. r. Soc. Biol. *103,* 620 (1930).

42. *Schmidt et Hansen,* Sur l'adsorption de la toxine et de l'anatoxine tétaniques au moyen de l'hydrate d'aluminium.
C. r. Soc. Biol. *106,* 314 (1931).

43. *Ballinari*, Studien über die Anwendung der strömenden Adsorption (Chromatographie) zur Reinigung und Konzentrierung bakterieller Toxine.
Thèse de Berne 1941.

44. *Whittingham*, Brit. med. J. 1940, 292.
Cité par *Regamey et Grumbach*, Schweiz. med. Wschr. 1941, pg. 463.

45. *Parish* a. *Oakley*, Brit. med. J. 1940, 294.
Cités par *Regamey et Grumbach*, Schweiz. med. Wschr. 1941, pg. 463.

46. *Cooke, Hampton, Sherman a. Stull*, Allergy induced by immunization with tetanus toxoid.
J. amer. med. Assoc. *114*, 1854 (1940).

Curriculum vitae

Né le 26 février 1915 à Montreux, j'y ai fait mes études secondaires, que j'ai terminées au Gymnase de Lausanne par l'obtention, en été 1933, de la maturité fédérale et du baccalauréat ès-lettres. A l'exception d'un stage de quelques mois à Vienne en 1937, à la Clinique médicale universitaire, j'ai fait à Lausanne toutes mes études de médecine, et les examens fédéraux en été 1939. Depuis lors, j'ai travaillé comme assistant un an à l'Hôpital du Samaritain à Vevey, un an à la Maternité de Genève, puis, après de courts remplacements au Loryspital à Berne et au Sanatorium Albula à Davos, j'ai été assistant à l'Institut d'Hygiène et de Bactériologie à Berne et à la Clinique Infantile universitaire de Zurich.

Imprimerie Boivin & Bitterli
Berne · 1944